

University of Groningen

Transcriptional response of *Streptococcus pneumoniae* to varying concentrations of carbohydrates and metal ions

Manzoor, Irfan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Manzoor, I. (2015). *Transcriptional response of Streptococcus pneumoniae to varying concentrations of carbohydrates and metal ions*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting (Dutch Summary)

S. pneumoniae, ook wel de pneumokok genoemd, is een veelvoorkomende ziekteverwekker. De pneumokok is verantwoordelijk voor meer dan een miljoen doden per jaar wereldwijd, waaronder veel jonge kinderen. De bacterie nestelt achter in de neusholte waar hij in de meeste gevallen geen kwaad doet. Echter, de pneumokok kan zich vanuit de neusholte verspreiden naar andere delen van het menselijk lichaam, waar hij ernstige infecties kan veroorzaken. Hier kan de pneumokok verschillende voedingsstoffen tegenkomen, waaronder wisselende concentraties in metalen en koolhydraten. De pneumokok kan overleven op dit scala aan nutriënten door verscheidene genen te reguleren. Dit proefschrift draagt bij aan het begrip van deze regulatie op transcriptieniveau als reactie op koolhydraten en metalen. De regulatie van verschillende operons of regulons die belangrijk zijn voor virulentie wordt behandeld, waaronder het *fcs* operon, het PsaR regulon en het AdcR regulon.

Hoofdstuk 2 beschrijft de optimalisatie van de condities voor analyse van het transcriptoom van bacteriën. De techniek wordt behandeld van het moment van meting tot het analyseren van de data. Als men naar de tijd, kosten en precisie van de experimenten kijkt, blijkt dat de gebruikte techniek, DNA microarray-analyse, erg zinvol, en in het algemeen te gebruiken is voor het bestuderen van bacteriële transcriptomen. Wij hebben DNA microarray-analyse toegepast op de pneumokok als een casestudie, door de transcriptomen te vergelijken wanneer de pneumokok in verschillende concentraties L-serine groeide.

Het RNA werd geïsoleerd met behulp van een Macaloïd methode en een RNA-isolatiekit en de kwaliteit van het RNA werd gecheckt door een RNA-kwaliteitscontrolekit te gebruiken. Het RNA werd omgezet in cDNA met reverse-transcriptase en het cDNA werd gelabeld met één van twee amine-reactieve fluorescente labels. Zelfgemaakte DNA microarray-slides werden gebruikt voor hybridisatie van de cDNA samples, en microarray-data werd geanalyseerd met het programma *Microprep*. Daarna werd het programma *Cyber-T* gebruikt om de genen te vinden die in significant verschillende hoeveelheden werden afgeschreven. De data werd daarna nog verder geanalyseerd met verschillende, eigen software (*PePPER*, *FIVA*, *DISCLOSE*, *PROSECUTOR*, *Genome2D*).

In **Hoofdstuk 3** wordt het effect van fucose op het transcriptoom van *S. pneumoniae* D39 onderzocht. De expressie van verschillende genen en operons waren veranderd wanneer fucose aanwezig was, waaronder het *fcs* operon, verantwoordelijk voor opname en verwerking van fucose. Door middel van kwantitatieve analyse demonstreren we dat de transcriptieregulator FcsR, op het genoom aanwezig voor het *fcs* operon, een activator is van de expressie van het *fcs* operon. We voorspellen ook een regulatie-site van 19 baseparen waar FcsR aan kan binden (5'-ATTTGAACATTATTCAAGT-3') in de promoterregio van het *fcs*

operon. De functionaliteit van de voorspelde FcsR regulatie-site werd bevestigd door experimenten waar het verwijderen van de helft van de regulatie-site, of het volledig verwijderen ervan, ervoor zorgde dat het *fcs* operon niet meer tot expressie werd gebracht.

Mangaan (Mn^{2+}), zink (Zn^{2+}) en koper (Cu^{2+}) zijn erg belangrijk voor transcriptieregulatie, fysiologie en de ziekteverwekkende eigenschappen van de pneumokok. Echter, het effect van het belangrijke metaal kobalt (Co^{2+}) op de genexpressie van de pneumokok was nog niet onderzocht. **Hoofdstuk 4** ontrafelt het effect van Co^{2+} op het transcriptoom van *S. pneumoniae* D39. Door middel van zoeken via BLAST werd duidelijk dat het genoom van de pneumokok een operon bevat dat mogelijk is betrokken bij Co^{2+} -transport (*cbi* operon). Hier laten wij zien dat het *cbi* operon is geïnduceerd bij een hoge Co^{2+} -concentratie. Verder blijkt dat Co^{2+} , net als eerder is aangetoond voor Zn^{2+} , derepressie van de genen van het PsaR regulon kan veroorzaken, dat het Mn^{2+} -opnamesysteem PsaBCA, het cholinebindende eiwit PcpA en het celwandgeassocieerde eiwit PrtA bevat. Terwijl Mn^{2+} de expressie van het PsaR regulon onderdrukt en Co^{2+} leidt tot een vermindering van repressie, stimuleren beide metalen de interactie van PsaR met de promoters waar het aan bindt. Deze data zal worden besproken in de context van voorgaande studies op vergelijkbare transcriptieregulators.

Hoofdstuk 5 onderzoekt de regulatie van het PsaR regulon afhankelijk van verschillende Ni^{2+} -concentraties. Hier combineren we qRT-PCR-analyse, metaalaccumulatie-assays, β -galactosidase-assays en elektroforetische mobiliteitsshift-assays om aan te tonen dat een toename van de Ni^{2+} -concentratie leidt tot een hogere expressie van het PsaR regulon. Onze ICP-MS data laat zien dat de geïnduceerde expressie van het PsaR regulon direct is gelinkt met een hoge Ni^{2+} -concentratie, hetgeen de Mn^{2+} -concentratie in de cel verlaagt. Studies gedaan *in vitro* met gezuiverd PsaR tonen aan dat Ni^{2+} de Mn^{2+} -afhankelijke interactie van PsaR met de promoterregionen van zijn target-genen vermindert. Hiernaast is de Ni^{2+} -afhankelijke rol van de transcriptieregulator PsaR, zoals gereguleerd door het PsaR regulon, bestudeerd met behulp van DNA microarray-analyse.

De transcriptoomanalyse van *S. pneumoniae* in de aanwezigheid van Ni^{2+} wordt besproken in **hoofdstuk 6**. Voor meerdere transitietalen, zoals Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} en Co^{2+} , is aangetoond dat ze de expressie van verscheidene genen belangrijk voor de virulentie van de pneumokok. Echter, het effect van Ni^{2+} op de globale genexpressie van *S. pneumoniae* is nog niet onderzocht. Hier identificeren we een aantal genen en operons waarvan de expressie verandert in aanwezigheid van hoge extracellulaire Ni^{2+} -concentraties. De virulentiegenen die

horen bij het AdcR regulon (*adcRCBA*, *phtA*, *phtB*, *phtD* en *phtE*), het PsaR regulon (*prtA*, *pcpA* en *psaBCA*) en het $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ -effluxsysteem *czcD* waren aanzienlijk gestegen in expressie in aanwezigheid van Ni^{2+} . Met behulp van DNA microarray-analyse, elektroforetische mobiliteitsshift-assays, en β -galactosidase-assays tonen we aan dat Ni^{2+} directe invloed heeft op de derepressie van *adcRCBA*, *adcAII-phD*, *phtA*, *phtB* en *phtE* via de Zn^{2+} -afhankelijke repressor AdcR. Het tegenovergestelde effect van Zn^{2+} en Ni^{2+} op het AdcR regulon is ook tot in detail onderzocht. We kunnen concluderen dat de rol van Ni^{2+} in de regulatie van virulentiegenen in het AdcR regulon verder is opgehelderd.

